

REPÚBLICA DE CUBA

285/2000

APR 08 2002

RECEIVED



Lic. Emilia Lara Díaz, Vice-Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número doscientos ochenta y cinco del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **COMPOSICIONES VACUNALES PARA LA INMUNOTERAPIA ACTIVA ESPECÍFICA DEL CÁNCER**, con fecha seis de diciembre de dos mil, a las diez horas pasado meridiano, por Josefa Lombardero Valladares, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación de CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR, cuya invención fue creada por Luis Enrique Fernández Molina; Belinda Sánchez Ramírez; Eduardo Raúl Suárez Pestana; Anabel de la Barrera Aira y Rolando Pérez Rodríguez.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Josefa Lombardero Valladares, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los dieciocho días del mes de diciembre de dos mil uno.



RESUMEN

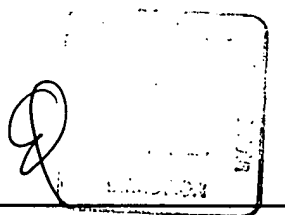
Título: *Composiciones vacunales para la inmunoterapia activa específica del cáncer.*

Resumen de la Invención:

La presente invención está relacionada con el campo de la inmunoterapia activa específica del cáncer y en particular con la obtención de composiciones vacunales para la inducir o incrementar la respuesta inmune contra receptores de factores de crecimiento autólogos que estén sobreexpresados en la membrana de algunos tipos de tumores y que están vinculados con el crecimiento tumoral.

Dichas composiciones contienen receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, o alternativamente sus variantes que comprenden el dominio extracelular de dichos receptores con y sin región transmembrana, unidos a proteoliposomas de muy baja talla con gangliósidos incorporados (siglas en inglés, VSSP-G), siendo dichos gangliósidos los que se asocian específicamente a los receptores en forma de agrupaciones moleculares de membrana, y empleándose un adyuvante apropiado.

La presente invención además se relaciona con el uso de las composiciones vacunales para la prevención y tratamiento del cáncer, particularmente cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, gliomas, así como en enfermedades crónicas no transmisibles.



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

Composiciones vacunales para la inmunoterapia activa específica del cáncer.

Sector Técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología en particular con la inmunoterapia activa específica del cáncer.

La invención se relaciona además con nuevas composiciones vacunales para inducir o aumentar la respuesta inmune contra receptores de factores de crecimiento autólogos vinculados con el desarrollo de algunos tipos de tumores

Técnica Anterior

Los receptores de factores de crecimiento con actividad quinasa en residuos de tirosina han mostrado tener una estrecha relación con el desarrollo de tumores y de metástasis tumorales, y se ha probado su valor en algunos casos como indicadores de mal pronóstico en cáncer. Tal es el caso de receptores como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF o HER-1), el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2), y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (R-PDGF).

El REGF es una glicoproteína transmembrana de 1186 aminoácidos y 170 kD de peso molecular que se encuentra ampliamente expresada en los tejidos del organismo, y ha sido implicada en varias etapas del desarrollo embriogénico. La unión de sus ligandos específicos, EGF o TGF- α , induce la dimerización del receptor así como también la heterodimerización con otros miembros de la familia ErbB, entre ellos el HER-2 (Cohen BD *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271:7620-7629). La unión de los ligandos al receptor dispara una cascada de señales intracelulares (Ullrich A and Schlessinger J (1990) *Cell* 61:203-212) que conducen al crecimiento y diferenciación de las células. La sobreexpresión de este receptor en algunos tipos de neoplasias, fundamentalmente de origen epitelial, ha sido blanco de atención en la inmunoterapia del cáncer. Tal es el caso de tumores de mama, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, próstata y tumores de cabeza y cuello. La presencia de REGF ha probado ser una indicación de mal pronóstico en cáncer de mama (Pérez R *et al.* (1984) *Breast Cancer and Treatment* 4:189-193). Aún cuando no se conoce todavía el papel que juega el sistema del EGF / REGF en la regulación del crecimiento

tumoral, se ha sugerido que la expresión del REGF en células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación autocrina que conduce a la proliferación descontrolada de dichas células (Schlessinger J *et al.* (1983) *Crit Rev Biochem* 14 (2):93-111).

La proteína oncogénica HER-2/neu, es una glicoproteína transmembrana de 1255 amino ácidos, miembro de la familia de los receptores de factores de crecimiento, que está implicada en la transformación maligna y es biológicamente relevante en la patogénesis del cáncer. HER-2 está presente en células normales con una sola copia, y en los tejidos tumorales el gen está amplificado y/o la proteína sobreexpresada, lo que hace de esta proteína un blanco relativamente selectivo de células malignas. Esta sobreexpresión es característica de la mayoría de los adenocarcinomas humanos como útero, próstata, estómago, pulmón, mama, y ovario, y está asociada en estos dos últimos con un mal pronóstico de la enfermedad (Slamon D *et al.* (1989) *Science* 244:707-712).

El PDGF, un polipéptido dimérico que existe como heterodímero u homodímero, es un factor altamente mitogénico para fibroblastos, células gliales y células del músculo liso vascular. Este polipéptido ejerce su acción por unión a sus receptores (tipo alfa y beta), y es sintetizado y segregado por una variedad de células normales y también por tejido neoplásico. Tanto el PDGF como sus receptores han sido encontrados en tejidos de glioma humano (Fleming T *et al.* (1992) *Cancer Res* 52:4550-4553) y esto sugiere que la estimulación autocrina del crecimiento a través del PDGF contribuye al fenotipo maligno de los tumores (Heldin CH (1992) *EMBO J* 11:4251-4259). Así mismo, una actividad anormalmente alta de PDGF parece jugar un papel central en la etiología de ciertas situaciones patofisiológicas adversas como la aterosclerosis, la restenosis, fibrosis pulmonar, glomerulonefritis y artritis reumatoide.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se encuentran localizados fundamentalmente en la membrana plasmática de un número amplio de células de mamíferos. En tumores, sin embargo, algunos gangliósidos se encuentran sobreexpresados formando agrupaciones moleculares membranas específicas con proteínas transductoras de señales intracelulares (Hakomori SI *et al.* (2000) *J Biol Chem* May 19;275(20):15174-81). De esta manera, se han descrito gangliósidos que son moduladores de proteínas kinasas, entre ellas la proteína kinasa C, relacionada con receptores de factores de crecimiento (Goldering JR *et al.* (1985)

J Neurochem 44:1229-1234). También se ha demostrado que los gangliósidos se relacionan de forma específica con los receptores de factores de crecimiento. Un ejemplo bien estudiado es la interacción entre el gangliósido GM3 y el HER-1, donde se ha demostrado que GM3 inhibe la autofosforilación de HER-1 (Bremer EG *et al.* (1986) *J Biol Chem* 261:2434-2440; Suárez E, *et al.* (1997) *Br J Cancer* 75(2):213-220; Suárez E *et al.* (1999) *Oncogene* 18:4069-4079). Así mismo podría el GM3 relacionarse con heterodímeros formados por HER-1/HER-2, a través de su interacción específica con HER-1. Por otra parte se sabe que la autofosforilación del receptor del PDGF es inhibida específicamente por gangliósidos como el GM1 y en alguna medida el GM2, no así por GM3 (Yates AJ (1995) *J Neuro Oncology* 24:65-73).

Por su alta expresión en tumores, el REGF ha sido blanco de inmunoterapia pasiva (IP) con anticuerpos monoclonales en forma nativa, asociados a drogas, toxinas, o isótopos radiactivos (Vollmar AM *et al.* (1987) *J Cell Physiol* 131:418-425). Varios ensayos clínicos con AcMs se están llevando a cabo y algunos han mostrado resultados promisorios como es el caso del ensayo clínico con el AcM C225 en cáncer de mama, de células pancreáticas y de células renales en fase II y cabeza-cuello en fase III (Mendelsohn J *et al.* (1999) American Society of Clinical Oncology Meeting). Otro ensayo clínico de Fase II con buenos resultados es el ensayo efectuado con el AcM IOR egf/r3 en tumores de cabeza y cuello (Crombet T *et al.* (2000) *Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical*, manuscrito aceptado). En cambio la inmunoterapia activa específica (IAE) utilizando como blanco el REGF no ha sido nunca desarrollada, siendo las causas de ésto su baja inmunogenicidad como molécula propia y su amplia expresión en los tejidos del organismo, lo cual ha determinado el temor de los inmunólogos a considerar esta opción (Disis ML and Cheever MA (1996) *Current Opinion in Immunology* 8:637-642). La IAE tiene ventajas sobre la IP por cuanto ésta última no activa la rama efectora celular específica de la respuesta inmune, y su efecto depende de la vida media de los anticuerpos utilizados, siendo generalmente necesario reinfusiones continuadas para lograr los efectos deseados. Nosotros hemos desarrollado una inmunoterapia activa específica utilizando como blanco este receptor (REGF), a partir de la inmunización con un preparado vacunal que contiene al REGF autólogo unido a proteoliposomas de muy baja talla que tienen incorporado el GM3. Esta

vacunación ha inducido una respuesta inmune específica para el REGF autólogo, sin efectos secundarios.

Por otra parte, la proteína HER-2 constituye un blanco muy atractivo para la inmunoterapia de tumores que la expresan. La inmunoterapia pasiva empleando AcMs contra HER-2 ha tenido resultados alentadores. Actualmente se encuentra registrado para la terapia de pacientes con cáncer de mama, combinado con quimioterapia, el AcM Herceptin, un AcM específico para HER-2 (Gilewski T *et al.* (2000) *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl:S23-6). Por otra parte, han sido desarrolladas estrategias de vacunación con péptidos derivados de HER-2 que se encuentran actualmente en ensayo clínico en pacientes con cáncer de mama y ovario (Disis ML *et al.* (1999) *Clin Cancer Res* Jun;5(6):1289-97), siendo los resultados hasta el momento bastante discretos.

El R-PDGF por su parte, no ha sido explotado como blanco para la inmunoterapia del cáncer hasta nuestros días, a pesar de su demostrada relación con algunos tipos de tumores.

En el desarrollo de vacunas ha tomado un papel primordial el empleo de vehículos vacunales eficaces. Entre ellos han sido muy utilizados las proteínas de shock térmico y los motivos CpG de ADN (Hartmann G *et al.* (1999) *Proc Natl Acad Sci*, 96: 9305-9310). Otra línea de vehículos vacunales son los derivados de bacterias Gram negativas siendo un ejemplo de ello los proteoliposomas de muy baja talla derivados de *Neisseria meningitidis*, empleados en las composiciones vacunales descritas en la presente invención. En nuestro caso, estos últimos tienen la ventaja sobre los otros mencionados de que nos permiten combinar receptores de factores de crecimiento y gangliósidos moduladores de sus funciones, simulando las asociaciones moleculares que ocurren naturalmente en la superficie de las células blanco.

La utilización de VSSP como vehículo vacunal tiene una serie de ventajas debido a sus peculiares propiedades inmunomoduladoras. Al vacunar ratones con VSSP-G se inducen altos títulos de IgM y de IgG contra los respectivos gangliósidos, entre los que se encuentran GD3, NGcGM3 y GM3, estos últimos ampliamente expresados en los tejidos y por consiguiente poco inmunogénicos. Notoriamente la respuesta IgG inducida no se restringe al isotipo IgG3, sino que responde a isotipos relacionados con un patrón Th1

(Estévez F *et al.* (1999) *Vaccine* Aug 20, 18(1-2):190-7). Además, recientemente hemos demostrado que la VSSP-G induce maduración de Células Dendríticas (DC) tanto humanas como murinas. Estas DC maduras activan las células T, las cuales producen IFN- γ , indicando la inducción de un patrón Th1 (Mesa C *et al.* Manuscrito en preparación).

Las composiciones vacunales descritas en la presente invención, constituyen una solución superior al problema de la inmunogenicidad de los receptores de factores de crecimiento y su impacto en el tratamiento de los tumores, debido a que estos receptores con actividad tirosina quinasa y los gangliósidos que específicamente se asocian a éstos en forma de agrupaciones moleculares de membrana, se presentan simultáneamente al sistema inmune del hospedero en el contexto de las señales de peligro aportadas por el VSSP, necesarias para activar a las DC de forma efectiva, y producir presentación cruzada. Estas composiciones vacunales, además de presentarle sus componentes al sistema inmune simulando las asociaciones moleculares en que ellos se encuentran naturalmente en las células tumorales, hacen innecesario el empleo de técnicas químicas de conjugación de proteínas que generan nuevos epítopes inmunodominantes espúreos. Por otro lado esta solución tecnológica permite usar las estructuras íntegras de los receptores, favoreciendo el fenómeno de la inmunodominancia, a diferencia de otras que usan péptidos derivados y que son más limitadas por las restricciones genéticas.

Composiciones vacunales para la inmunoterapia activa específica del cáncer.

Descripción detallada de la invención

Más específicamente la invención consiste en composiciones vacunales para el tratamiento del cáncer. Dichas composiciones vacunales contienen como principio activo uno o más receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares, pudiendo o no contener estos últimos los dominios transmembranarios. Además estas composiciones contienen como vehículo vacunal proteoliposomas de muy baja talla derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y los gangliósidos que se asocian específicamente con dichos receptores, formando agrupaciones moleculares de membrana. Estas composiciones vacunales contienen adicionalmente un adyuvante apropiado.

Las composiciones vacunales serán usadas en la inmunoterapia activa específica de tumores como cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, gliomas, así como en enfermedades crónicas no transmisibles.

1. Antígenos de las composiciones vacunales:

En la presente invención los antígenos de las composiciones vacunales son los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa sobreexpresados en tejidos tumorales y alternativamente sus dominios extracelulares, con o sin región transmembrana, y que tienen una relación específica con gangliósidos expresados en la membrana de las células tumorales. Este es el caso de HER-1, HER-2 y el receptor del PDGF, entre otros.

Los receptores de factores de crecimiento que se refieren son proteínas obtenidas por vía recombinante a través de clonajes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) según los procedimientos regulares de Biología Molecular (Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) en plasmidios de expresión en células superiores. Los plasmidios conteniendo los genes que codifican para los receptores o sus variantes son transfectados establemente en células superiores como HEK 293 (ATCC CRL 1573), NIH-3T3 (ATCC CRL 1658),

CHO (ATCC). Los receptores o sus variantes son expresados por las líneas transfectadas en sus membranas o son secretados al sobrenadante según sea el caso.

Estos antígenos son extraídos de la membrana de las células superiores que los expresan o del sobrenadante de cultivo de dichas células y purificados por cromatografía. Posteriormente son filtrados en condiciones estériles y liofilizados. Se conservan a 4°C. Las cantidades óptimas de éstos antígenos en las formulaciones vacunales oscilan entre 1 µg y 1000 µg por dosis.

2. Vehículos vacunales de las composiciones vacunales:

Como vehículos vacunales se utilizan proteoliposomas de muy baja talla con gangliósidos incorporados (VSSP-G). Los gangliósidos seleccionados son aquellos que se asocian de manera específica con los receptores de factores de crecimiento formando agrupaciones moleculares de membrana, siendo éste el caso de GM3 y GM1, entre otros.

Estos proteoliposomas se obtienen según se refiere en la patente europea EP 94203736.7, en las patentes USA 5, 7888, 985 y USA 6,149,921, y en el artículo Estevez F *et al.* (1999) *Vaccine* Aug 20;18(1-2):190-7. Los proteoliposomas se encuentran presentes en la composición vacunal en un rango entre 1 µg y 1000 µg referidos a cantidad de gangliósidos por dosis vacunal.

3. Adyuvación de las composiciones vacunales:

Para potenciar la inmunogenicidad de las composiciones vacunales descritas en la presente invención, es conveniente usar un adyuvante que permita la formación de emulsiones agua en aceite o aceite en agua. Las composiciones vacunales referidas en esta invención son adyuvadas en AIF empleando relaciones entre 40/60 v/v y 60/40 v/v dependiendo del tipo de emulsión deseado.

4. Preparación de las composiciones vacunales que contienen receptores de factores de crecimiento, VSSP-G y AIF:

Las composiciones vacunales referidas en esta invención pueden prepararse de diversas maneras:

- a) A los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no, región transmembrana) liofilizados (1-100 mg de proteína), se añaden cantidades de soluciones de VSSP-G, que permitan garantizar una relación de masa receptor/gangliósido en un rango entre 0.1/1 a 1/1. Se procede a mezclar por agitación, entre 4°C y 20°C, durante un intervalo de tiempo entre 5 minutos y 24 horas. Esta preparación se conserva a una temperatura de 4°C hasta el momento de su administración al hospedero.

Justo antes de administrarse al hospedero, el preparado anteriormente descrito se mezcla por agitación con AIF en relación volumen/volumen entre 40/60 y 60/40, durante un intervalo de tiempo entre 10 y 30 minutos, a temperatura ambiente. Las relaciones de volumen cubren el rango adecuado para el tipo de emulsión deseada según la vía de inoculación al hospedero.

- b) Otra manera de proceder, igualmente conveniente, consiste en conservar por separado recipientes conteniendo los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no región transmembrana) liofilizados y las soluciones de VSSP-G, a 4°C. Justo antes de administrarse al correspondiente hospedero, a los receptores de factores de crecimiento se les añaden cantidades de soluciones de VSSP-G, se procede a preparar la composición vacunal de la misma manera descrita en el inciso a).
- c) Una tercera manera de proceder consiste en combinar más de un receptor de factor de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no región transmembrana) con las correspondientes soluciones de VSSP-G en la composición vacunal. Las cantidades de cada uno de los antígenos en la composición vacunal estarán en cualquier proporción que cubra el rango entre 1 µg y 1000 µg por dosis vacunal. Así mismo las

cantidades de cada uno de los gangliósidos en forma de VSSP-G en la composición vacunal estarán entre 1 µg y 1000 µg por dosis vacunal.

Para preparar la vacuna combinada, los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no región transmembrana) que formarán parte de ésta son liofilizados en las cantidades referidas en el inciso correspondiente. A continuación se les añaden cantidades de soluciones de los VSSP-G que permitan garantizar una relación de masa receptores/gangliósidos en un rango entre 0.1/1 a 1/1. Se procede a mezclar por agitación, entre 4°C y 20°C, durante un intervalo de tiempo entre 5 minutos y 24 horas. Esta preparación se conserva a una temperatura de 4°C hasta el momento de su administración al hospedero.

Justo antes de administrarse al hospedero, el preparado anteriormente descrito se mezcla por agitación con AIF en relación volumen/volumen entre 40/60 y 60/40, durante un intervalo de tiempo entre 10 y 30 minutos a temperatura ambiente. Las relaciones de volumen cubren el rango adecuado para el tipo de emulsión deseada, según la vía de inoculación al hospedero.

- d) Otra manera de preparar la vacuna combinada referida en el inciso c) es según se refiere en el inciso b).

5. Administración al hospedero:

La administración al hospedero de las composiciones vacunales se puede realizar por diversas rutas: vía intramuscular, vía subcutánea, vía intranasal y vía intradérmica.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para esclarecer más aún las enseñanzas de la presente invención.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Obtención del antígeno de la composición vacunal: Dominio extracelular del R-EGF murino (ECD-REGFm).

El gen que codifica para el ECD-REGFm fue amplificado empleando la técnica de PCR, a partir de ADN complementario (ADNc) de hígado de ratón. El PCR se realizó mezclando 1 µg de DNAc con, 10 pmoles de cada cebador específico. Posteriormente se adicionó 0.2 mMolar de cada dNTP y 1 U de Taq polimerasa. Se realizaron 30 ciclos de PCR con temperaturas de 94°C, 1 min (excepto en el primer ciclo que fueron 3 min); 56°C, 1 min; 72°C, 1 min y 30seg (excepto en el último ciclo que fueron 5 min). El gen amplificado fue clonado en el vector de expresión en células superiores pcDNA3 (Amp^r, f^{ori}, ColE ori, CMV-Promotor, SV40 ori, SV40pa, Neomycin, Invitrogen), y posteriormente células de la línea HEK-293 fueron transfectadas establemente con este plasmidio. La transfección fue llevada a cabo siguiendo el método y crecidas en un medio selectivo. El ECD-REGFm se obtiene a partir del sobrenadante de la línea HEK-293/ECD-REGFm que expresa establemente el ECD-REGFm.

El ECD-REGFm obtenido en el sobrenadante de cultivo es purificado por técnicas de cromatografía de afinidad, acoplando el ligando a la matriz (*Affinity Chromatography principles and methods* 3:12, Pharmacia fine Chemicals); posteriormente es filtrado en condiciones estériles, y liofilizado.

Ejemplo 2: Obtención de la composición vacunal que comprende el ECD-REGFm, VSSP-GM3 y Montanide ISA 51, combinando todos los componentes justo antes de la administración.

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 incorporado fueron obtenidos según se refiere en la patente europea EP 94203736.7 y en las patentes USA 5, 7888, 985 y USA 6,149,921. La cantidad de vehículo vacunal empleado fue de 120 µg referido a cantidad de gangliósidos incorporado en los proteoliposomas por dosis vacunal.

Para preparar el inmunógeno, 1 mg de ECD-REGFm fue liofilizado y conservado a 4°C hasta el momento de la inmunización. Justo antes de la administración a los ratones, se añadieron al antígeno 2.4 mg de VSSP-GM3 (referidos a cantidad de gangliósido) en un volumen de 1 mL y se mezclaron ambos componentes a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de Montanide ISA 51 y se realizó la mezcla por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 3: Obtención de la composición vacunal que comprende el ECD-REGFm, VSSP-GM3 y Montanide ISA 51 combinando parte de los componentes y conservando la mezcla hasta el momento de la administración.

Las proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 fueron obtenidas según se refiere en las patente europea EP 94203736.7 y en las patentes USA 5, 7888, 985 y USA 6,149,921. La cantidad de vehículo vacunal empleado fue de 120 µg referido a cantidad de gangliósidos por dosis vacunal.

Para preparar el inmunógeno, 1 mg del ECD-REGFm fue liofilizado, y a continuación se le añadieron 2.4 mg de VSSP-GM3 (referidos a cantidad de gangliósido incorporado), en un volumen de 1 mL. Se mezclaron ambos componentes a temperatura ambiente durante 15 minutos y fueron conservados a 4°C hasta el momento de la inmunización. Justo antes de la administración a los ratones se añadió 1 mL de Montanide ISA 51 y se realizó la mezcla por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 4: Obtención de la vacuna combinada comprendiendo el ECD-HER-1, el ECD-HER-2, VSSP-GM3 y Montanide ISA 51.

Las proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 fueron obtenidos según se refiere en las patente europea EP 94203736.7y en las patentes USA 5, 7888, 985 y USA 6,149,921. La cantidad de vehículo vacunal empleado fue de 120 µg referido a cantidad de gangliósidos incorporado en los proteoliposomas por dosis vacunal.

Para preparar el inmunógeno, 1 mg del ECD-HER-1 y 1 mg del ECD-HER-2 fueron liofilizados juntos, y conservados a 4°C hasta el momento de la inmunización. Justo antes de la administración a los ratones, se añadieron 2.4 mg de VSSP-GM3 (referidos a cantidad de gangliósido) en un volumen de 1 mL. Se mezclaron todos los componentes a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de Montanide ISA 51 y se realizó la mezcla por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 5: Inducción de respuesta inmune específica al R-EGF autólogo por la composición vacunal.

Ratones de la línea C57BL/6 se inmunizaron con la composición vacunal que contiene el ECD-REGFm /VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51, preparada según se refiere en el ejemplo 2. La dosis de inmunógeno fue de 50 µg por ratón referido a cantidad de antígeno en la composición. El esquema de inmunización seguido comprendió tres dosis por vía intramuscular cada quince días, con extracciones de sangre los días 0, 21, 35 y 56 después de la primera inmunización. Como referencia se tomó un grupo de ratones de la misma línea inmunizado con 50 µg del ECD-REGFm conjugado químicamente a KLH y adyuvado en ACF y AIF, siguiendo el mismo esquema de inmunización. Los sueros obtenidos fueron ensayados por ELISA para su reconocimiento al ECD-REGFm. El ELISA se realizó recubriendo la placa con 10 µg/mL de ECD-REGFm. Después de bloquearse la placa con PBS/suero de ternera 5%, fueron incubados los sueros de los animales inmunizados y controles a diferentes diluciones. A continuación se añadió un conjugado de anticuerpos anti-IgG de ratón (específico para el Fc) con fosfatasa alcalina (Sigma). Todas las incubaciones antes mencionadas se realizaron durante 1 hora a 37°C y después de cada uno de los pasos mencionados se realizaron tres lavados con PBS/Tween 20 0.05%. La reacción se reveló con la adición de 1 mg/mL de sustrato (p-nitrofenilfosfato) en tampón dietanolamina, pH 9.8. La absorbancia a 405 nm fue medida en un lector de ELISA a los 30 min.

El 100% de los ratones inmunizados con nuestra composición vacunal desarrolló una respuesta de anticuerpos específicos contra el ECD-REGFm, que aumentó durante el curso de las inmunizaciones, llegando a alcanzar títulos de hasta 1/160000, mientras que los

sueros preinmunes no reconocieron al ECD-REGFm. El isotipo de la respuesta de anticuerpos desarrollada fue fundamentalmente del tipo IgG, característico de proteínas inmunogénicas.

La distribución de subclases de la respuesta de anticuerpos inducida fue determinada por ELISA. El 20.21% de los anticuerpos fue IgG2a, un 36.03% IgG1 y un 38.93% fue IgG2b, apreciándose un corrimiento hacia el patrón de respuesta Th1 respecto al grupo de referencia. Ver figura 1.

A pesar de que la presente composición vacunal se compara con una composición en la que el ECD-REGFm está acoplado químicamente a KLH, y en donde se emplea como adyuvante el ACF, los títulos de anticuerpos inducidos por la preparación son superiores, y la distribución de subclases tiende más a un patrón Th1, resultando favorable para la eficacia de dicha vacuna.

Los ratones inmunizados con ECD-REGFm/VSSP-GM3/Montanide ISA 51 no presentaron signos de toxicidad clínica, y las pruebas bioquímicas realizadas a los sueros de dichos animales no mostraron diferencias con las realizadas a los sueros de animales no inmunizados.

Tabla de frecuencia de animales respondedores

Grupos	Animales respondedores	Títulos de IgG						
		1/100	1/500	1/1000	1/2500	1/5000	1/10000	1/20000
	Día 21							
I	8/10	1	3	1		1	1	1
II	10/10		1	1	2	5	1	
	Día 35	1/100	1/1000	1/2500	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000
I	10/10		2		2	1		5
II	10/10		1			2	1	6
	Día 56	1/1000	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000	1/80000	1/160000
I	10/10	1	1	1	2	1	4	
II	10/10		1		1	2	4	2

Grupo I – Animales inmunizados con ECD-REGFm/KLH/ACF y AIF

Grupo II – Animales inmunizados con ECD-REGFm/VSSP-GM3/Montanide-ISA 51

Ejemplo 6: Reconocimiento de los sueros de ratones inmunizados con el DEC-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51 a células que expresan el EGF-R humano.

Células de la línea A431 (10000 células/punto) que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano fueron incubadas con suero preinmune de ratones C57BL/6 diluidos 1/5 (A), anticuerpo monoclonal ior egf-r3 contra el EGF-R como control positivo a una concentración de 10 µg/mL (B) y suero de ratones C57BL/6 inmunizados diluidos 1/5 (C), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El exceso de anticuerpos no unido al receptor o unido de forma inespecífica fue removido realizando lavados con solución de fosfato tamponada/suero de ternera 0.5%. Para la inmunodetección las células fueron incubadas con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína diluido 1/50, 30 minutos a temperatura ambiente. La intensidad de la fluorescencia fue medida en un citómetro de flujo (FACS). El suero de los ratones inmunizados con el preparado vacunal reconocieron las células que expresan el REGF, con intensidades comparables a las del control positivo del experimento, a diferencia de los sueros preinmunes de los mismos animales. Ver figura 2.

Ejemplo 7: Actividad citolítica de los sueros de ratones inmunizados con DEC-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51

Células de la línea A431 (3×10^6 células) fueron incubadas con cromato de sodio radioactivo ^{51}Cr durante 1h, y el exceso de sales radiactivas fue eliminado mediante tres lavado con medio de cultivo. Las células cargadas con ^{51}Cr fueron incubadas con:

- i) 50 µg/mL del anticuerpo monoclonal ior-t3 (AcM contra el CD3, como control negativo)
- ii) 50 µg/mL del anticuerpo monoclonal ior egf-r3 (AcM contra el EGF-R como control positivo)
- iii) suero preinmune de ratones C57BL/6 diluidos 1/20

iv) suero de ratones C57BL/6 inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3 y adyuvado en Montanide ISA 51 diluidos 1/20

Después de 1 hora de incubación a 37°C, se añadieron 40 µL de complemento de conejo dejándose en incubación a 37°C. Posteriormente se centrifugaron los tubos y 100 µL del sobrenadante se utilizaron para medir en un contador gamma de radiactividad la liberación de ^{51}Cr , como una medida de la lisis celular ocurrida mediada por los anticuerpos y el complemento. La incorporación total se midió mediante lisis total con detergente.

Los sueros de los ratones inmunizados con el preparado vacunal referido lisaron el 80 % de las células A431 que expresan el REGF, a diferencia de los sueros preinmunes de dichos ratones que solo alcanzaron a lisar un 35 %. Ver figura 3.

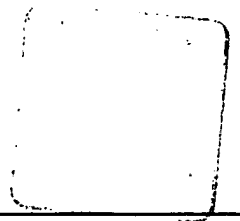

Ejemplo 8: Capacidad neutralizante de los sueros de ratones inmunizados con DEC-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51.

Los sueros de ratones inmunizados con el preparado vacunal referido en la patente fueron ensayados para su capacidad de inhibir la unión del EGF a su receptor en la membrana de las células A431. Para ello, las células A431 fueron crecidas en placas de cultivo hasta la confluencia. Una vez confluentes, fue añadido un pool de suero inmune a diferentes diluciones (1/5, 1/10, 1/20, 1/40) y a continuación se añadió EGF-¹²⁵I a razón de 100000 cpm/pozo. El volumen de cada pozo fue completado hasta 500 µL de PBS/BSA 1% en cada pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y pasado este tiempo la reacción fue detenida añadiendo 2 mL de PBS/BSA 1% frío. Posteriormente se desechó el líquido de cada uno de los pozos, y después de un lavado suave con PBS/BSA 1%, se añadieron a los pozos 300 µL de NaOH 2M. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se recogieron 200 µL de cada uno de los pozos, y se leyeron en un contador de radiaciones gamma.

El pool de sueros inmunes mostró una inhibición de la unión del EGF-¹²⁵I a su receptor en la membrana de las células A 431. Esta inhibición fue dependiente de la dilución del suero. Ver figura 4.

Ejemplo 9. Sobrevida de los ratones inmunizados con DEC-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51.

Ratones de la línea C57/BL6, inmunizados con ECD-REGFm/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51 (tres dosis de 50 µg cada quince días por vía intramuscular), se trasplantaron con 100000 células de Lewis por vía intramuscular y fueron observados para determinar el tiempo de sobrevida. Las células de Lewis son derivadas de un adenoicarcinoma de pulmón de origen murino que expresan el REGF. La sobrevida de estos ratones se comparó con la de un grupo inmunizado con ECD-REGFm/ACF (tres dosis de 50 µg cada quince días por vía subcutánea). Los ratones inmunizados el preparado vacunal ECD-REGFm/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51 tuvieron una sobrevida significativamente superior ($p<0.05$) que los ratones del grupo de referencia. Ver figura 5. ✓



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Breve descripción de las figuras:

Figura 1. Distribución de subclases de los anticuerpos inducidos a partir de la inmunización con ECD-REGFm/VSSP-GM3/Montanide ISA 51

Sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con ECD-REGFm/KLH/ACF (I) o ECD-REGFm/VSSP-GM3/Montanide ISA 51 (II) fueron ensayados por ELISA para la determinación de la distribución de subclases de IgG inducida por la inmunización.

Figura 2. Reconocimiento de los sueros de ratones inmunizados con el DEC-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51 a células que expresan el EGF-R.

Células de la línea A431, fueron incubadas con suero preinmune de ratones C57BL/6 (A), anticuerpo monoclonal ior egf-r3 como control positivo (B) y suero de ratones C57BL/6 inmunizados (C). Para la inmunodetección, un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a un fluoróforo fue utilizado. La intensidad de la fluorescencia fue medida en un citómetro de flujo.

Figura 3. Actividad citolítica de los sueros de ratones inmunizados con ECD-HER-1 VSSP/GM3 adyuvado en Montanide ISA 51.

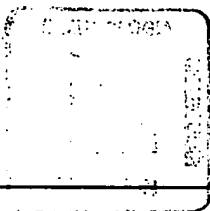

Células A431 cargadas con ^{51}Cr fueron incubadas con complemento y: I) Anticuerpo monoclonal ior-t3 (contra el CD3, como control negativo), II) Anticuerpo monoclonal ioregf-r3 (contra el EGF-R, como control positivo), III) suero preinmune de ratones C57Bl/6, IV) suero de ratones C57BL/6 inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51. V) Igual número de células que en los puntos anteriores fueron lisadas con detergentes como medida de la incorporación total de ^{51}Cr . Los resultados son presentados en % de lisis específicas.

Figura 4. Capacidad neutralizante de los sueros de ratones inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51

Células A 431 fueron incubadas con diluciones 1/5, 1/10, 1/20 y 1/40 de un pool de sueros de ratones inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3 adyuvado en Montanide ISA 51 o con las mismas diluciones de un pool de sueros preinmunes. EGF-¹²⁵I (100000 com) fué añadido en cada pozo y la unión total fue medida incubando las células con el EGF125I. Las CPM fueron medidas en un contador de radiaciones gamma.

Figura 5. Sobrevida de los ratones inmunizados con el ECD-REGFm/VSSP-GM3/Montanide ISA 51 trasplantados con Tumor de Lewis.

Ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados según se refiere en el ejemplo 9, fueron trasplantados con 100000 células de Tumor de Lewis y observados para medir sobrevida. Como grupo de referencia fueron trasplantados ratones de la misma cepa inmunizados con ECD-REGFm/ACF.



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

Composiciones vacunales para la inmunoterapia activa específica del cáncer.

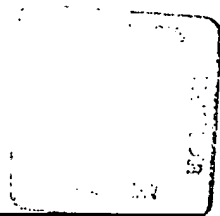
Reivindicaciones:

1. Composiciones vacunales para la inmunoterapia activa específica de cáncer donde dichas composiciones contienen como principio activo uno o más receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares mezclados con un vehículo vacunal que consiste en proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* los cuales contienen gangliósidos incorporados y que adicionalmente se mezclan con un adyuvante apropiado.
2. Composiciones vacunales según la reivindicación 1 donde los dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento pueden contener o no la región transmembrana.
3. Composiciones vacunales según reivindicación 1, en las que los receptores de factores de crecimiento son el HER-1, HER-2, R-PDGF o cualquiera de sus variantes que contenga el dominio extracelular con y sin región transmembrana.
4. Composiciones vacunales según reivindicaciones 1 y 2, en las que la cantidad efectiva de los receptores de factores de crecimiento, o de sus variantes está entre 1 y 1000 μg por dosis vacunal.
5. Composiciones vacunales según reivindicación 1 donde los gangliósidos incorporados a los proteoliposomas son aquellos que se asocian específicamente con los receptores de factores de crecimiento en forma de agrupaciones moleculares de membrana.
6. Composiciones vacunales según las reivindicaciones 1 y 5 donde los gangliósidos asociados específicamente con los receptores de factores de crecimiento en forma de agrupaciones moleculares de membrana. son GM3 y GM1.
7. Composiciones vacunales según reivindicaciones 1, 5 y 6 en las que la cantidad efectiva de gangliósido está entre 1 y 1000 μg por dosis vacunal.

8. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 7, donde receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares, con y sin región transmembrana y los gangliósidos en forma de VSSP-G a combinar están en una relación de masa de 0.1/1 hasta 1/1, receptor de factor de crecimiento o sus dominios extracelulares, con y sin región transmembrana/gangliósido.
9. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 9, en las que el adyuvante empleado es un adyuvante oleoso.
10. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 10, en las que el adyuvante empleado es AIF.
11. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 10, en las que el adyuvante empleado AIF es Montanide ISA 51.
12. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 12 en las que el adyuvante se utiliza en proporciones entre 40/60 y 60/40 volumen/volumen oleoso/acuoso.
13. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 13 en las que el adyuvante utilizado es el Montanide ISA 51.
14. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 5 y de la 11 a la 14, conteniendo el HER-1 o su dominio extracelular, con y sin región transmembrana, VSSP-GM3 y Montanide ISA 51.
15. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 5 y de la 11 a la 14 conteniendo el R-PDGF o su dominio extracelular, con y sin región transmembrana, VSSP-GM1 y Montanide ISA 51.
16. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 14, conteniendo el HER-1 y HER-2 combinados y/o sus dominios extracelulares, con y sin región transmembrana, VSSP-GM3 y Montanide ISA 51.
17. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 18, que desarrollan una respuesta inmune contra receptores de factores de crecimiento epidérmico sus dominios

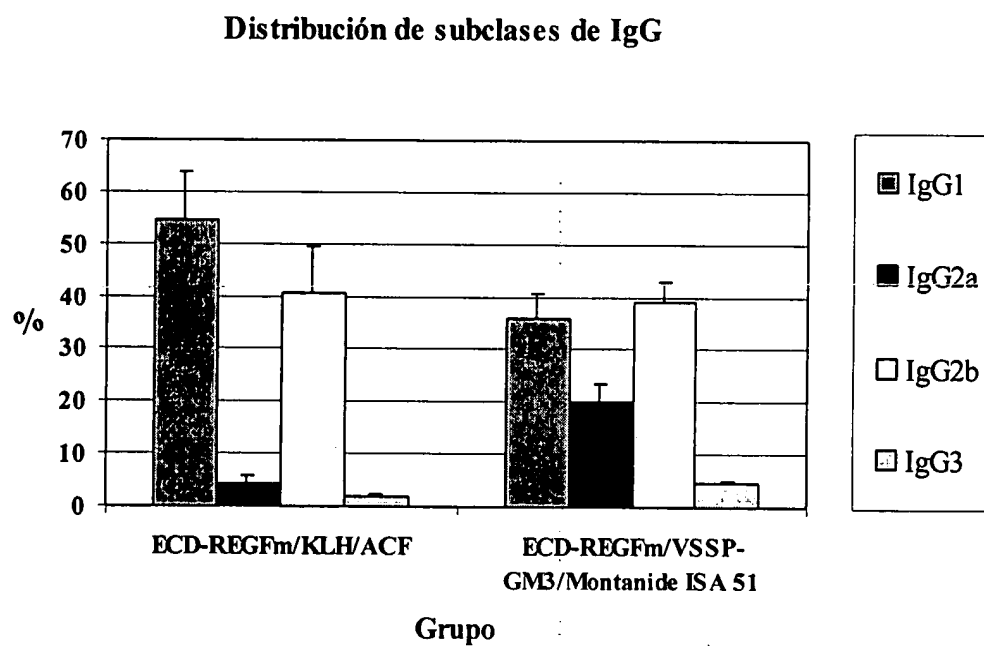
extracelulares, con y sin región transmembrana, al ser administrados a un hospedero por vía intramuscular, subcutánea, intranasal o intravenosa.

18. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 19, utilizadas para la prevención y tratamiento del cáncer, particularmente cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, cerebro, gliomas, así como en enfermedades crónicas no transmisibles.



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 1.

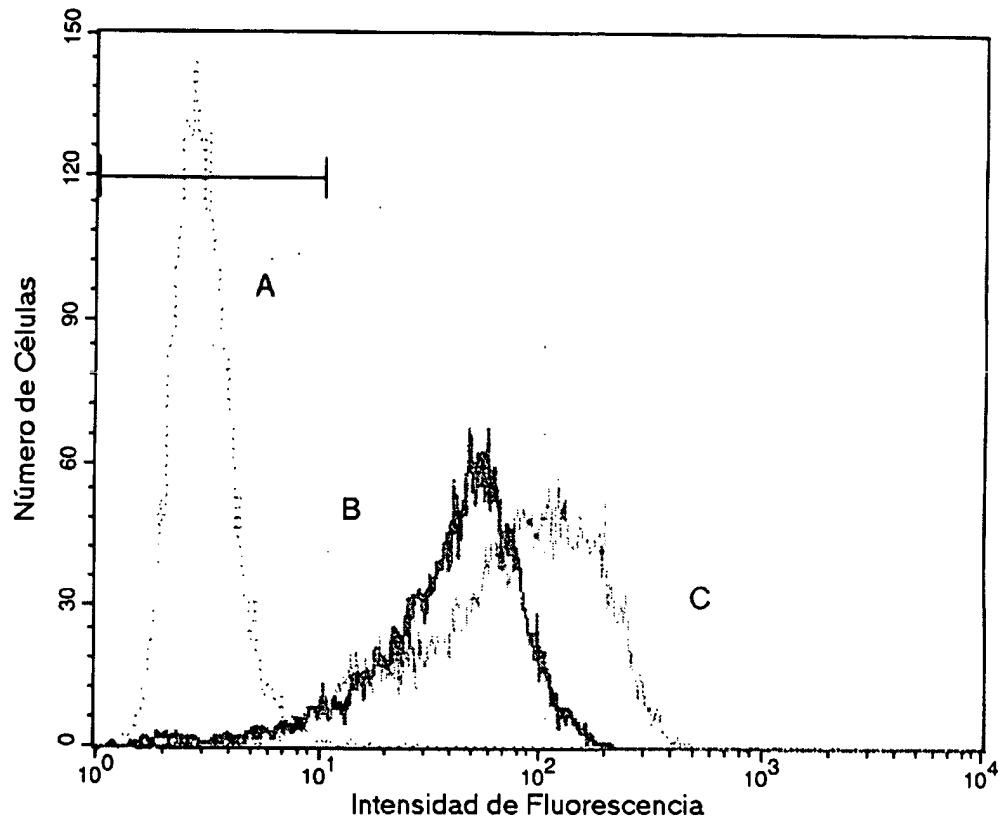


A handwritten signature in black ink is positioned to the left of a rectangular stamp. The stamp contains some illegible text and a date, possibly '12/05/2003'.

Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 2.

Reconocimiento específico de los sueros de ratones inmunizados




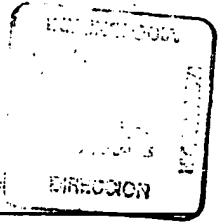
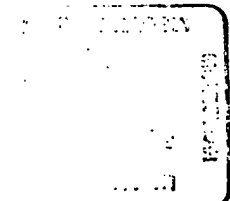

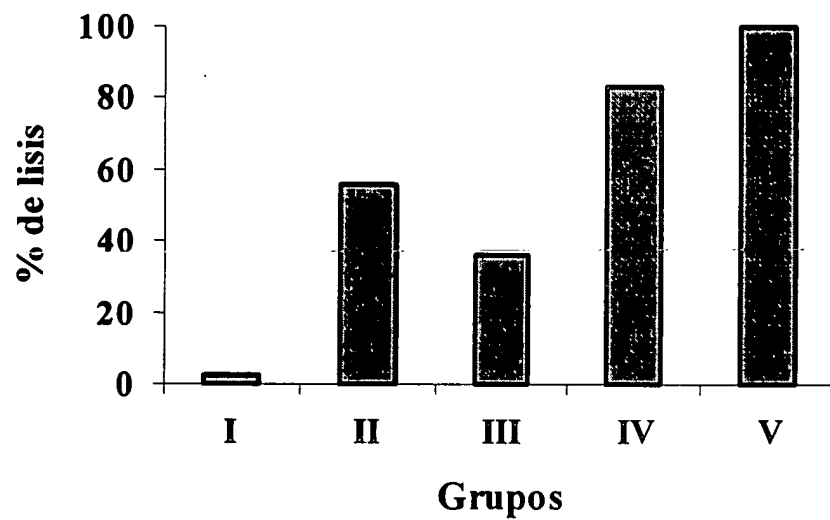


Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

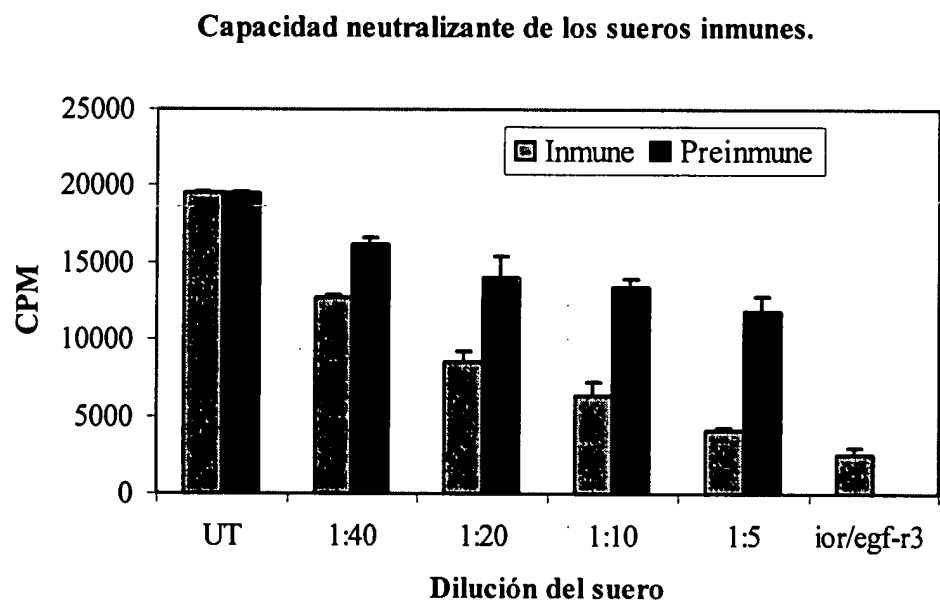
Figura 3.

Actividad citolítica de los sueros de ratones inmunizados



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 4.




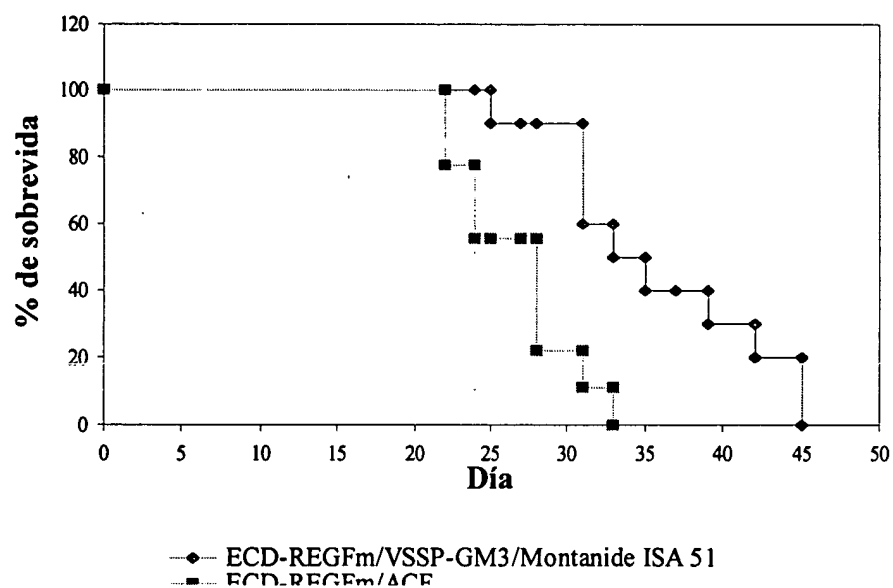


Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 5.

Sobrevida de ratones C57BL/6 inmunizados y trasplantados con Tumor de Lewis




Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular